

**UJI SITOTOKSIK FRAKSI ETIL ASETAT EKSTRAK ETANOL
AKAR PASAK BUMI (*eurycoma longifolia jack*) TERHADAP
SEL KANKER T47D DENGAN METODE 3-(4,5 dimetiltiazol -2-il)-
2,5 difenil tetrazolium bromide (MTT)**

Mahfur

Program Studi Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Pekalongan

Email: Mahfur.isfa@gmail.com

ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of death in the world, there were 14.1 million cancer cases and 8.2 million of them cause deaths occurred in 2012. The data from BPJS, in January-June 2014 were reported for outpatient treatment of cancer ranks second with 88.106 the number of cases, while for inpatient ranks 5th, with the number of 56.033 cases. Of the many types of cancer, breast cancer is a common malignancy and a major cause of death in women. Chemotherapy is a cancer treatment using a drug that destroy cancer cells. Anticancer drugs in question are cytotoxic drug (a chemotherapeutic agent) such as taxol, bleomycin, doxorubicin, 5-fluorourasil, chlorambucil. The activity of cytotoxic drug is not selective, because they are either toxic to cancer cells and normal cells. Other treatments that can be used to therapy of cancer is using natural product. *Eurycoma longifolia Jack* is one plant native of Indonesia which has anti-cancer potential. One of The compounds that have the ability cytotoxic is eurycomanone. This study aims to determine Cytotoxic effects of ethyl acetate fraction ethanol extract of *Eurycoma longifolia Jack* to T47D cancer cells by the method of MTT. The sample used are the roots of *Eurycoma longifolia Jack*, as much as 500g sample were extracted with ethanol. The extract obtained is then fractionated using ethyl acetate solvent. The fractions obtained tested cytotoxic ability by the method of 3- (4,5 dimetiltiazol -2-yl) - 2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) to determine IC₅₀ value. The yield resulting from the extraction process was 2.99% or 14,95 g. ethyl acetate soluble fraction amounted to 19.73% from the totally extract. MTT assay results showed IC₅₀ ethyl acetate fraction of ethanol extract *Eurycoma longifolia Jack* at 340 µg / ml

Keywords: *Eurycoma longifolia Jack*, eurycomanone, T47D cells, anticancer, MTT.

PENDAHULUAN

Kanker payudara merupakan keganasan yang sering ditemukan pada perempuan, dengan insiden sebesar 20% dari seluruh keganasan (Jemal *et al.*, 2008). Menurut data BPJS, pada periode Januari-Juni 2014 dilaporkan pengobatan kanker untuk rawat jalan menempati urutan ke-2 dengan jumlah kasus 88.106, sedangkan untuk rawat inap menempati urutan ke-5, dengan

jumlah kasus 56.033. Diperkirakan kasus kanker tahunan akan meningkat dari 14 juta pada 2012 menjadi 22 juta dalam dua dekade berikutnya (Depkes RI, 2012).

Kemoterapi merupakan pengobatan kanker menggunakan suatu obat yang merusak sel kanker. Obat antikanker yang dimaksud adalah obat-obat sitostatika (agen kemoterapi) seperti taxol, bleomycin, doksorubisin, 5-fluorourasil,

klorambusil, tiotepa, alkaloid indol seperti vinblastin, dan vinkristin (Siswandono *et al.*, 2000). Obat sitostatika bekerja tidak selektif karena bersifat toksik baik pada sel kanker maupun sel normal, terutama sel normal yang kecepatan proliferasinya tinggi seperti pada sum-sum tulang belakang. Obat ini juga dapat mematikan sel normal yang lain yang aktif berproliferasi seperti sel-sel rambut, kulit, kelenjar kelamin, janin, dan gastrointestinal.

Salah satu ciri sel kanker adalah tidak sensitif terhadap sinyal antiproliferasi. Oleh karena itu, pengobatan penyakit kanker dengan obat-obat sitostatik konvensional umumnya menggunakan dosis besar. Peningkatan dosis obat sitostatik menimbulkan masalah karena semakin banyak sel normal yang terserang dan mati. Selain itu, peningkatan dosis dapat menyebabkan sel kanker cepat menjadi resisten terhadap obat (Hanahan *et al.*, 2000).

Pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) merupakan salah satu tanaman asli Indonesia yang memiliki potensi antikanker. Kandungan kimia akar pasak bumi adalah alkaloid, stigmasterol, kampesterol, pikrasidin, skopoletin, kuasinoid, neo-kuasin, glaukarubin, sedrin, saponin, eurikomalakton, dan eurikomanon (Low *et al.*, 2005). Ekstrak metanol, butanol, kloroform, dan air dari akar pasak bumi terbukti memiliki efek sitotoksik terhadap sel

KB, DU-145, RD, MCF-7, CaOV-3, dan MDBK (Nurhanan *et al.*, 2005). Potensi pasak bumi sebagai antikanker perlu dikembangkan, salah satunya adalah dengan mengembangkan potensi dari fraksi etil asetat.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek sitotoksik fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi terhadap sel kanker T47D dengan metode MTT

METODE PENELITIAN

Metode yang digunakan dalam penelitian ini termasuk dalam kelompok metode eksperimental.

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah seperangkat alat masersi, alat-alat gelas (pyrex), neraca analitik, rotary evaporator, *corong buchner*, cawan penguap, batang pengaduk, stirer, water bath, beker glass, mikropipet, *mikroplate reader*, gelas ukur, cover slip, dan mikroskop cahaya.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah akar pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack), PBS, RPMI, MTT, Stopper (SDS), DMEM, etanol 70%, etil asetat, aquadest, NH₄Cl.

Jalanya penelitian ini diuraikan sebagai berikut.

1. Ekstraksi akar pasak bumi

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan merendam 500 g serbuk ke dalam etanol (70%) analisis sebanyak 3 liter distirer selama 3 jam kemudian didiamkan selama 24 jam,

kemudian maserat diperas dengan kain flannel dan proses maserasi diulang 3 kali. Filtrat diuapkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu 60°C sampai diperoleh ekstrak kental

2. Pembuatan fraksi etil asetat

Pembuatan fraksi etil asetat dilakukan dengan cara 95% ekstrak etanol dilakukan partisi dengan etil asetat 1: 2,5 (ekstrak etanol : etil asetat). Partisi dilakukan 3x dan fraksi etil asetat dipekatkan. Fraksi etil asetat dikumpulkan dan kemudian dievaporator sampai diperoleh fraksi kental (Nurani, 2011).

3. Uji sitotoksik.

Sel T47D sebanyak 100 µL didistribusikan ke dalam sumuran mikropate 96-wells, kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator dengan aliran 5% CO₂ pada suhu 37°C. Setelah inkubasi 24 jam diberi perlakuan dengan fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi masing-masing konsentrasi 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 µg/ml. Semua perlakuan tersebut diinkubasi lagi selama 24 jam. Setelah inkubasi 24 jam, masing-masing sumuran ditambahkan larutan 10 µL MTT 5 mg/mL. Langkah selanjutnya plate yang telah ditambahkan MTT diinkubasi lagi 4 jam pada suhu 37°C. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk warna ungu. Reaksi dengan MTT dihentikan dengan menambah reagen stopper yaitu

larutan *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) 10% dalam asam klorida 0,01N sebanyak 100 µL pada tiap sumuran dan didiamkan sampai 24 jam. Selanjutnya, diukur absorbansinya dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 550 nm (Nurani, 2011).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi Akar Pasak Bumi

Ekstrak akar pasak bumi (*E. longifolia*) dibuat dengan metode maserasi yaitu dengan cara perendaman dan pengadukan serbuk akar pasak bumi menggunakan cairan penyari etanol 70% selama 24 jam.

Pertimbangan menggunakan pelarut etanol 70% ini berdasarkan sifat etanol yang semipolar sehingga menguntungkan untuk menyari senyawa-senyawa yang sifatnya polar sampai nonpolar, termasuk diantaranya eurikumanon. Selain itu etanol juga dipilih karena mempunyai sifat nontoksik dan dapat sebagai pengawet karena etanol juga dapat membunuh bakteri (antiseptik). Berdasarkan penelitian Laela (2011) disebutkan bahwa hasil IC₅₀ terlihat bahwa ekstrak etanol mempunyai efek sitotoksik yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak kloroform dan ekstrak air pada sel T47D. Hal tersebut menunjukkan bahwa etanol merupakan pelarut yang mampu menyari zat aktif sitotoksik dalam tanaman akar pasak bumi yang lebih baik dibandingkan kloroform dan air.

Berat rendemen ekstrak yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rendemen ekstrak etanol akar pasak bumi (*E. longifolia*)

Keterangan	Ekstrak Etanol akar pasak bumi (<i>E. longifolia</i>)
Berat serbuk (gram)	500 g
Berat ekstrak (gram)	14,95 gram
Rendemen (%)	2,989 %

Hasil rendemen yang diperoleh sesuai atau mendekati dengan penelitian yang dilakukan oleh ruqiah *et al* (2011) sebesar 2,75%. Secara organoleptis ekstrak yang diperoleh berwarna coklat gelap, kental, berminyak, rasa pahit, dan mempunyai bau yang khas.

Pembuatan Fraksi Etil Asetat Akar Pasak Bumi.

Fraksinasi adalah proses pemisahan senyawa aktif dalam *crude extract* sampel berdasarkan tingkat polaritas senyawa. Dalam proses ini dilakukan fraksinasi dengan menggunakan pelarut etil asetat. Pemilihan etil asetat atas dasar polaritas yang berbeda dari etanol sehingga diharapkan adanya pemisahan senyawa dalam ekstrak etanol.

Penggunaan fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi juga dikarenakan nilai IC_{50} tersebut lebih kecil dibandingkan fraksi tak larut etil asetat, ekstrak etanol dan ekstrak kloroform yang diujikan pada sel T47D (Nurani, 2011). Cara fraksinasi ini diharapkan mampu melarutkan zat-zat dengan optimal.

Dalam penelitian ini diperoleh fraksi yang larut etil asetat dan tidak larut etil asetat, dengan rendemen fraksi yang larut etil asetat sebesar 19,73% dan yang tidak larut etil asetat 73,38%.

Uji Sitotoksik

Uji sitotoksik ini bertujuan untuk mengetahui efek sitotoksik fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi terhadap sel T47D. Seri kadar konsentrasi akar pasak bumi dapat dilihat pada tabel 2.

Uji sitotoksitas fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasar bumi terhadap sel T47D dilakukan dengan menggunakan metode MTT. Prinsip metode MTT adalah pengukuran yang dilakukan secara kolorimetri yang didasarkan terjadinya pembentukan garam formazan tidak larut berwarna ungu dari reaksi reduksi tetrazolium yang sifatnya larut dalam air dengan menghasilkan larutan berwarna kuning. Reagen MTT hanya bereaksi dengan sel yang masih hidup kemudian dipecah melalui reaksi reduksi oleh sistem reduktase suksinat tetrazolium membentuk formazan (Doyle and Griffiths, 2000).

Keuntungan menggunakan MTT test ini adalah cepat, sensitif, akurat dan banyak sampel yang bisa diuji. Kelemahan metode ini jika senyawa yang diteliti berwarna, dapat menyebabkan adanya absorbansi yang diberikan oleh sampel, sehingga harus menggunakan kontrol sampel pada

pembacaan. Hal ini dilakukan agar nilai absorbansi yang diperoleh pada perhitungan benar-benar berasal dari warna ungu formazan hasil metabolisme garam tetrazolium oleh sel hidup setelah dikurangi absorbansi kontrol sampel, dengan kata lain nilai absorbansi tersebut menunjukkan hasil pengaruh sampel saja. Penelitian ini menggunakan kontrol sel berisi sel dan media yang digunakan untuk mengetahui jumlah awal sel. Kontrol media hanya berisi media saja untuk mengeliminasi asumsi bahwa kematian sel disebabkan oleh media. Hasil perlakuan dengan uji MTT pada penelitian ini terlihat gambaran kristal kristal berwarna ungu yang tidak larut dalam air tetapi larut dalam SDS 10%.

Meiyanto (2000) menyatakan bahwa ekstrak dengan IC_{50} yang kecil mempunyai efek antikanker yang lebih baik. Nilai IC_{50} fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Tingkat konsentrasi fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi pada uji sitotoksik

No	Konsentrasi Fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi ($\mu\text{g/ml}$)
A	2000
B	1000
C	500
D	250
E	125
F	62.5
G	31.125

Hasil uji sitotoksik pada kelompok fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi yang diujikan pada sel T47D diperoleh nilai % kehidupan tertinggi pada konsentrasi $31,12\mu\text{g/ml}$ yaitu sebesar 85,48% dan persen kehidupan terendah pada konsentrasi $2000\mu\text{g/ml}$ yaitu sebesar 1,92 %. Persamaan regresi linear $y=bx+a$ dan perhitungan nilai IC_{50} fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi pada sel T47D adalah $340\mu\text{g/mL}$

Tabel 3. Hasil perhitungan nilai IC_{50} fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi pada sel T47D

Keterangan	Fraksi etil aetat ekstrak etanol APB
Persamaan	$y=162,6090804-44,47943072x$
IC_{50}	$50=162,6090804-44,47943072x$
$\text{Log } IC_{50}(x)$	2.531711368
$IC_{50}(x)$	340

Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa nilai IC_{50} fraksi etil asetat ekstrak etanol APB ($340\mu\text{g/mL}$) dan hasil tersebut menggambarkan bahwa efek sitotoksik dari fraksi etil asetat ekstrak etanol kurang poten, karena dalam penelitian lain menunjukan bahwa konsentrasi yang dianggap poten untuk aktifitas sitotoksik adalah tidak boleh lebih besar dari $60\mu\text{g/mL}$ terhadap sel kanker (Meiyanto, 2000).

Senyawa yang bisa digunakan untuk menekan dosis agen kemoterapi pada ekstrak pasak bumi diantaranya adalah euriokomanon (Zakaria *et al*, 2009) yang bekerja

menginduksi apoptosis pada gen *p-53* (Mahfudh & Lope Pihie., 2008) serta longilactone yang bekerja menginduksi apoptosis pada jalur ekstrinsik yaitu melalui kaspase 7,8 dan 9 (Muhamad *et al.*, 2011). Dalam kajian awal, ekstrak metanol akar *E. longifolia* menunjukkan efek sitotoksik secara *in vitro* pada sel leukemia limfosit murin (P-388) (Nurhanan *et al.*, 2005). Ekstrak metanol tumbuhan ini juga dilaporkan mempunyai aktivitas terhadap sel kanker payudara (MCF-7) dan menginduksi apoptosis. Mekanisme kerja dari fraksi etil asetat ekstrak etanol akar pasak bumi belum diketahui secara pasti karena dalam penelitian ini tidak dilakukan.

SIMPULAN

Berdasarkan penelitian dapat disimpulkan bahwa : fraksi etil asetat ekstrak etanol APB (*Eurycoma longifolia* Jack.) mempunyai efek sitotoksik terhadap sel T47D dengan nilai IC₅₀ 340 µg/mL.

Saran yang diberikan adalah perlu diperjelas tempat asal akar pasak bumi agar lebih jelas dalam mengetahui potensi, karena letak geografis mempengaruhi kandungan senyawa yang dimiliki suatu tanaman.

DAFTAR PUSTAKA

DEPKES RI, 2015, *menkes-canangkan-komitmen-penanggulangan-kanker-di-indonesia*. Diakses melalui <http://www.depkes.go.id>

Doyle, A., dan Griffiths, J. B. 2000. *Cell and Tissue Culture for Medical Research*. New York. John Willey and Sons

Han, X., Pan, J., Ren, D., Cheng, Y., Fan, P., and Lou, H., 2008, Naringenin-7-O-glucoside protects against doksorubisin-induced toxicity in H9c2 cardiomyocytes by induction of endogenous antioxidant enzymes, *Food Chem Toxicol*, 46:3140-3146.

Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000, The Hallmarks of Cancer, *Cell*, 100: 57-70

Heyne, K., 1987, *De Nuttige Planten Van Indonesia* (II), diterjemahkan Badan Litbang Departemen Kehutanan, Penerbit Yayasan Sarana Wana Jaya, Jakarta.

Low, B.S., NG, B.H., Choy, W.P., Yuen, K.H., and Chan, K.L., 2005, Bioavailability and Pharmacokinetic studies of *Eurycoma longifolia*, *Plant Med*, 71(9): 803-7.

Mahfudh & Lope Pihie., 2008., *Eurycomanonee* Induces Apoptosis through the Up-Regulation of p53 in Human Cervical Carcinoma Cells., *J. Cancer Mol*. 4(4): 109-115.

Meiyanto, 2009, Prosedur Tetap Pengamatan Ekspresi Protein dengan Metode Imunohistokimia, *CCRC*, 03-012-01

- Muhamad, S., A. H. L. Pihie, J. Latif, *et al.* 2011, Induction of apoptosis in MCF-7 via the kaspase pathway by longilactone from *Eurycoma longifolia* Jack, *Res. Pharm. Bio*, 3: 1-10.
- Nurani, L. H., 2011, Mekanisme molekuler akar pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) sebagai antikanker dan kemopreventif, *Disertasi*, Fakultas Kedokteran UGM, Yogyakarta,
- Nurhanan, M. Y., L. P. Hawariah, A. M. Ilham, *et al.*, 2005, Cytotoxic effects of the root extracts of *Eurycoma longifolia* Jack, *Phytother Res*, 19(11): 994-996.
- Siswandono, Soekardjo, B., 2000, Kimia Medisinal, Edisi 2, Airlangga University, Surabaya
- Zakaria, Y., A. Rahmat, A. H. L. Pihie, *et al.*, 2009, *Eurycomanonee* induce apoptosis in HepG2 cells via up-regulation of p53, *Cancer Cell Intl*, 9(16): 1-21.